UNIVERSITA' DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

433

E. AQUARONE

QUALCHE RICERCA SU DI ALCUNI LIEVITI OSMOFILI

Estratto da « *Annali Facoltà di Agraria* » - Vol. XXII, 1961

Tipografia Editrice Comm. U. GIARDINI - Pisa 1961

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
15 NOV 1962

UNIVERSITA' DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

433

E. AQUARONE

QUALCHE RICERCA SU DI ALCUNI LIEVITI OSMOFILI

Estratto da « *Annali Facoltà di Agraria* » - Vol. XXII, 1961

Tipografia Editrice Comm. U. GIARDINI - Pisa 1961

Viene dato il nome di « osmofili » a quei lieviti che si dimostrano capaci di sviluppare anche in presenza di elevate quantità di zuccheri o elevate quantità di sali (« lieviti alofili »).

Numerose sono state le specie descritte come capaci di vivere in presenza di alte concentrazioni zuccherine; ma la revisione sistematica di LODDER e KREGER-VAN RIJ [1] consente di ritenere la maggior parte di queste specie sinonimi di *Saccharomyces Rouxii* Boutroux, *Sacch. Rouxii* var. *polymorphus* (Kr. et Kr.) LODDER et KREGER-VAN RIJ. A queste specie è dato di aggiungere come tollerante elevate concentrazioni zuccherine anche *Sacch. elegans* LODDER et KREGER-VAN RIJ incluso la sua varietà *intermedia* VERONA et ZARDETTO [2].

Si tratta di specie che si rinvengono in prevalente fase aploide e quindi primamente descritte come *Zygosaccharomyces*. Esse caratteristicamente prediligono, anche in natura, mezzi contenenti elevate quantità di zucchero tanto che la maggior parte degli isolati proviene da miele (o anche nettari), marmellate, sciroppi e succhi di frutta concentrati, uva supermatura, frutta secca o candita, ecc. Di tanto informa una buona rassegna (con relativa bibliogrfia) di MRAK e PHAFF [3]. A questa rimandiamo per più esaurienti informazioni.

I lieviti osmofili offrono dunque un particolare interesse che non è solo generale, ma anche pratico per l'importanza che assumono nell'industria alimentare e conserviera.

Stante gli estesi studi di KROEMER [4], di KRUMBHOLZ [4], di LOCH HEAD e Coll. [4], di SACCHETTI [4], di SCARR [5] e di altri già conosciamo

---

(*) L'A., che è L.D. presso l'Università di S. Paolo in Brasile, ha eseguito il presente lavoro nell'Istituto di Microbiologia Agraria usufruendo di una Borsa di Studio concessagli dalla « Campanha de Apperfeiçoamento do Pessoal de Nivel Superior ».

Lo stesso A. desidera ringraziare il Direttore dell'Istituto, Prof. Onorato Verona, per i consigli e gli aiuti di cui gli è stato prodigo.

qualche proprietà di questi lieviti (6). Sopratutto sappiamo che essi sono dotati di una scarsa attività enzimatica: infatti *Sacch. mellis* non fermenta che il glucosio pur non essendo esclusa una graduale lenta inversione acida del saccarosio (SCARR); *Sacch. Rouxii* fermenta glucosio e scarsamente il maltosio; *Sacch. elegans* glucosio e molto lentamente saccarosio. Limitata — per gli zuccheri — ne è anche la capacità di assimilazione.

Secondo KROEMER e KRUMBHOLTZ essi possono dividersi in due gruppi fisiologici. Un primo gruppo comprenderebbe le specie che prediligono elevate concentrazioni zuccherine e formano deboli quantità di acidi volatili. Un secondo gruppo comprenderebbe le specie che tollerano, ma non richiedono, elevate concentrazioni zuccherine; questi fermentano meno vigorosamente dei primi e producono acidi volatili in quantità variabili.

* *
* *

Nonostante quanto è stato acquisito, ulteriori notizie intorno alle caratteristiche biologiche e biochimiche di questi lieviti ci sono apparse desiderabili e tali da suggerire le indagini di cui si riferisce.

Diremo che abbiamo sperimentato con *Sacch. mellis* e *Sacch. elegans* in ceppi provenienti dal Centraalbureau voor Schimmelcultures di Baarn in Delft e che, con essi, abbiamo eseguito le ricerche seguenti:

1) Influenza della pressione osmotica, della temperatura e del pH iniziale del mezzo sull'andamento della prima fase del processo fermentativo.
2) Esigenze auxologiche delle due specie.
3) Punto termico di uccisione delle cellule vegetative.
4) I principali prodotti della fermentazione.

Invero per quanto si riferisce a *Sacch. elegans* già si hanno interessanti notizie per indagini compiute da RIBÉREAU GAYON e PEYNAND (7); ma esse non sono state condotte il profilo, da noi trattato, della osmofilia.

I — ANDAMENTO DELLA PRIMA FASE DEL PROCESSO FERMENTATIVO.

Nelle specie osmofile il processo fermentativo si svolge assai lentamente e quindi si protrae a lungo nel tempo. Indipendentemente dai risultati ottenibili a termine della fermentazione si è voluto vedere

come lo stesso processo inizia e poi si svolge durante le prime fasi in rapporto:

a) alla pressione osmotica e alla temperatura

b) al pH iniziale del mezzo alle diverse condizioni di pressione osmotica e di temperatura.

METODO — Fu usato come mezzo colturale il liquido di WILLIAMS (*) addizionato di glucosio in quantità tali da corrispondere alle seguenti pressioni osmotiche 20-30-40-50-60-70 atmosfere (**). In realtà, per la presenza di altri sali la pressione osmotica finale del liquido doveva considerarsi leggermente superiore a quella indicata. Abbiamo scelto un mezzo minerale, anzichè naturale (per es. mosto d'uva), onde poter sempre disporre di un mezzo a composizione definita e controllabile.

Per quanto si riferisce il pH esso fu controllato e quindi aggiustato, dopo sterilizzazione, intorno ai valori di 4 - 6 - 7.4. Come materiale di inoculo furono sempre usate colture giovani sviluppate su agar-malto e quindi disperse in acqua sterile avendo cura di inoculare sempre la stessa quantità di cellule.

La fermentazione fu condotta in matracci conici da cc. 250 contenenti cc. 100 di liquido e chiusi, dopo sterilizzazione e inoculo, con tappi muniti di valvola ad acido solforico.

L'andamento del processo fermentativo fu infatti seguito attraverso la valutazione giornaliera della perdita in peso di anidride carbonica.

Colture in termostato a 26°-30°-34° C.

RISULTATI.

I dati raccolti sono riferiti nelle annesse Tabelle.

Circa quanto si riferisce all'*influenza della pressione osmotica e della temperatura* essi indicano che:

a) sia *Sacch. mellis* che *Sacch. elegans* si dimostrano, in relazione al loro carattere di lieviti osmofili, capaci di fermentare se

(*) Tale la composizione del liquido di Williams:
solfato ammonico 6 g/l
fosfato diacido di potassio 2 g/l
solfato di magnesio 0,25 g/l
cloruro di calcio 0,25 g/l.
vitamine p. o.

(**) Zucchero aggiunto, rispettivamente, gr. %: 16.1 - 24.1 - 32.2 - 40.2 - 48.2 - 56.2.

TAB. I - *Influenza della pressione osmotica sullo sviluppo di CO_2 da parte di* Sacch. mellis *e* Sacch. elegans *coltivati in liquido di Williams a* 26° C.

	Dopo giorni	CO_2 g per 100 cc di liquido					
		20 atm.	30 atm.	40 atm.	50 atm.	60 atm.	70 atm.
Sacch. mellis	4	0.0870	0.0856	0.1270	—	—	—
	5	0.2084	0.1934	0.2626	0.2776	0.0536	0.1260
	6	0.3482	0.3006	0.3974	0.3408	0.1422	0.2768
	7	0.4680	0.4184	0.5312	0.6028	0.1824	0.3796
	8	0.5930	0.5266	0.6674	0.7982	0.3290	0.5272
	9	0.7162	0.6418	0.8076	1.0062	0.4292	0.6080
	10	0.8522	0.7480	0.9222	1.1376	0.5558	0.6750
	11	0.9744	0.8454	1.0300	1.2448	0.6250	0.7144
	12	1.0934	0.9364	1.1296	0.3400	0.6778	0.7470
	13	1.1964	1.0120	1.2124	1.4312	0.7388	—
	14	1.2900	1.0810	1.3070	1.5198	0.7846	—
	15	1.3748	1.1494	1.3704	1.5900	0.8176	—
	16	1.4546	1.2026	—	—	—	—
	17	1.5214	—	—	—	—	—
Sacch. elegans	3	0.3970	0.2912	0.1732	0.1158	0.1524	—
	4	0.7166	0.6392	0.4226	0.3678	0.4028	0.0138
	5	0.8742	0.8250	0.7450	0.5890	0.5466	0.1612
	6	0.9528	0.9606	1.0240	0.7244	0.6012	0.3212
	7	0.9970	1.0272	1.1990	0.8050	0.6424	0.3892
	8	1.0216	1.0720	1.2882	0.8706	0.6730	0.4030
	9	1.0454	1.1110	1.3778	0.9210	0.7152	0.4304
	10	1.0620	1.1406	1.4622	0.9728	0.7554	0.4480
	11	1.0734	1.1746	1.5410	1.0290	0.8020	0.4600
	12	—	—	1.5934	1.0784	0.8434	—
	13	—	—	1.6454	1.1298	—	—
	14	—	—	—	—	—	—

TAB. II - *Influenza della pressione osmotica sullo sviluppo di CO_2 da parte di* Sacch. mellis *e* Sacch. elegans *coltivati in liq. di Williams a* 30° C.

	dopo giorni	CO_2 g per 100 cc di liquido					
		20 atm.	30 atm.	40 atm.	50 atm.	60 atm.	70 atm.
Sacch. mellis	3	—	—	0.1122	0.1502	0.1050	—
	4	0.2704	0.2712	0.2852	0.3160	0.2462	0.940
	5	0.4714	0.4844	0.4784	0.5116	0.4030	0.1990
	6	0.6534	0.6376	0.6264	0.6648	0.5192	0.2840
	7	0.8050	0.7700	0.7712	0.7790	0.6240	0.3576
	8	0.9386	0.8782	0.8938	0.8624	0.6908	0.4128
	9	1.0458	—	0.9736	0.9342	0.7452	0.4566
	11	1.2122	—	1.1282	1.0512	0.8224	0.5408
	12	1.2648	—	1.1858	1.0930	0.8542	0.5710
	13	1.2962	—	1.2388	1.1336	0.8858	0.5942
	15	1.3364	—	1.3044	1.2092	0.9394	—
	16	—	—	1.3300	1.2346	0.9652	—
Sacch. elegans	2	0.2476	0.1956	0.1124	—	—	—
	3	0.6150	0.5724	0.4424	0.3464	0.1564	—
	4	0.8282	0.8310	0.7410	0.6436	0.4526	0.0970
	5	0.9262	0.9694	0.4426	—	0.6078	0.2954
	6	0.9788	1.0350	0.9426	0.8202	0.7054	0.4276
	7	1.0678	1.0888	0.9926	0.8594	0.7776	0.4904
	8	1.1382	1.1314	—	—	0.8438	0.5380
	9	1.2254	1.1708	1.0700	0.9116	0.9104	0.5932
	11	1.3734	1.2852	1.1946	0.9728	1.0240	0.6572
	12	1.4404	1.3464	1.2622	1.0058	1.0696	0.6686
	13	1.5060	—	1.3696	1.0612	1.1158	—
	15	1.6262	—	1.5124	1.1584	1.2221	—
	16	1.6770	—	1.5450	1.1934	1.2798	—

TAB. III - *Influenza della pressione osmotica sullo sviluppo di CO_2 da parte di* Sacch. mellis *e* Sacch. elegans *coltivati in liq. di Williams a* 34° C.

	dopo giorni	CO_2 g per 100 cc di liquido					
		20 atm.	30 atm.	40 atm.	50 atm.	60 atm.	70 atm.
Sacch. mellis	2	—		0.0372	0.0836	—	—
	3	0.1260		0.2184	0.3308	0.1376	—
	4	0.2758		0.4076	0.5286	0.2960	0.3296
	6	0.4904		0.6598	0.7898	0.4900	0.6470
	7	0.5402		0.7370	0.9044	0.5520	0.7702
	9	0.5654		0.8286	1.0950	0.6274	1.0060
	10	0.5672		0.8481	1.1672	0.6576	1.1530
	11	0.5672		0.8481	1.2124	0.6788	1.2932
	12	—		—	1.2500	0.6980	1.4090
	13				1.2754	0.7162	1.5044
	14						1.5846
	15						1.6632
	16						1.7462
Sacch. elegans	2	0.3064		0.2010	0.0526	0.0178	—
	3	0.6572		0.6054	0.3524	0.2486	—
	4	0.8162		0.8482	0.6416	0.4720	0.1724
	6	0.9722		1.0426	0.8856	0.6670	0.4388
	7	1.0040		1.0674	0.9448	0.7074	0.5108
	9	1.0240		1.0812	1.0086	0.7488	0.6164
	10	1.0310		1.0848	1.0246	0.7454	0.6456
	11	1.0310		1.0924	1.0378	0.7454	0.6646

TAB. IV - *Influenza del pH sullo sviluppo di CO_2 dal liq. di Williams e per opera di* Sacch. elegans *a diverse temperature e a diversa pressione osmotica (CO_2 g per 100 cc. di liquido).*

dopo giorni	a 26° C						a 34° C					
	a 20 atm.			a 70 atm.			a 20 atm.			a 70 atm.		
	pH 4.4	pH 6	pH 7.4	pH 4	pH 6	pH 7.6	pH 3.9	pH 6	pH 7.4	pH 4	pH 6	pH 7.6
2	0.0732	0.0410		—	—	—	—	—		—	—	—
3	0.4390	0.2408		—	—	—	0.1796	0.0318		0.0540	—	—
4	0.7230	0.6186		0.0028	—	—	0.4264	0.2388		0.1522	—	—
5	0.8754	1.1126		0.0378	—	—	0.6644	0.6276		0.3440	0.0108	—
6	0.9624	1.6136		0.1522	0.0016	—	0.7854	0.9280		0.5128	0.0628	—
7	1.0232	2.1794		0.2896	0.0230	—	0.8658	1.1488		0.6200	0.2204	—
8	1.0710	2.7386		0.3564	0.1060	—	0.9096	1.3240		0.6840	0.4404	—
9	1.1204	3.2158		0.3856	0.2372	0.0480	0.9274	1.4776		0.7370	0.7026	—
10	1.1582	3.5688		0.4062	0.5240	0.1644	0.9466	1.6282		0.7814	0.9360	0.0192
11	1.1930	3.8736		0.4174	0.8050	0.2976	0.9506	1.7498		0.8124	1.1592	0.1148
12	1.2230	3.8736		0.4312	1.0970	0.4832	0.9534	1.8562		0.8410	1.3310	0.2664
13	1.2434	4.2486		0.4492	1.3426	0.6608	0.9696	1.9548		0.8646	1.5090	0.4538
14	1.2668	4.3986		0.4602	1.6050	0.8368	—	2.0330		0.8840	1.6428	0.6298
15	1.2878	4.5388		0.4732	1.8154	1.0350	—	2.1020		0.9040	1.7820	0.7952
16	1.3050	4.6450		—	1.9820	1.2415	—	2.1486		—	1.8938	0.9350
17	1.3292	4.7518		—	2.1170	1.3954	—	2.1858		—	1.9858	1.0648
18	—	4.8370		—	2.2262	1.5908	—	2.2082		—	2.0604	1.1690
19	—	4.8972		—	2.3312	1.7464	—	2.2350		—	2.1218	1.2650
20	—	4.9576		—	2.4162	1.9048	—	2.2464		—	2.1712	1.3504
pH finale	2.5	3.—	—	2.8	3.2	4.8	2.9	3.6	—	2.9	3.7	4.9

non fermenta

TAB. IV[bis] - *Influenza del pH sullo sviluppo di CO_2 dal liq. di Williams e per opera di* Sacch. mellis *a diverse temperature e a diversa pressione osmotica* (*CO_2 g per* 100 *cc di liquido*)

dopo giorni	a 26° C						a 34° C					
	a 20 atm.			a 70 atm.			a 20 atm.			a 70 atm.		
	pH 4.1	pH 6.1	pH 7.5	pH 4.3	pH 6.2	pH 7.8	pH 4.1	pH 6.1	pH 7.5	pH 4.6	pH 6.2	pH 7.8
3	0.0218	—	—	—	—	—	0.0038	—	non fermenta	0.1894	0.0760	0.0356
4	0.0670	0.0382	—	—	—	—	0.0186	—		0.3562	0.3006	0.2424
5	0.1806	0.1432	—	0.0652	0.0612	0.0536	0.0636	—		0.5056	0.5638	0.5284
6	0.3296	0.2544	—	0.1662	0.2546	0.2522	0.1148	—		0.6230	0.7812	0.7940
7	0.5692	0.3584	0.0232	0.2672	0.4598	0.4936	0.1502	0.0406		0.7080	0.9414	0.9994
8	0.6992	0.4478	0.0310	0.3548	0.6462	0.6962	0.1882	0.1252		0.7800	1.1226	1.2056
9	0.8502	0.5284	0.0418	0.4214	0.8402	0.9300	0.2126	0.1832		0.8512	1.2648	1.3966
10	1.0074	0.6022	0.0438	0.4764	0.0118	1.1200	0.2316	0.2124		0.9056	1.3860	1.5694
11	1.1482	0.6740	0.0508	0.5248	1.1628	1.3108	0.2468	0.2252		0.9648	1.5016	1.7506
12	1.2700	0.7428	0.0542	0.5622	1.3038	1.4986	0.2772	0.2290		1.0066	1.6004	1.9156
13	1.3724	0.8140	....	0.5924	1.4270	1.6740	0.3024	0.2330		1.0432	1.6826	2.0528
14	1.4600	0.8904	0.0618	0.6166	1.5332	1.8276	0.3248	0.2480		1.0754	1.7562	2.1882
15	1.5934	1.0192	0.0652	0.6524	1.7234	2.0890	0.3586	0.2760		1.1186	1.8664	2.4292
17	1.6320	1.0740	0.0652	0.6632	1.8014	2.2066	0.3956	0.2972		1.1330	1.9066	2.5234
18	1.6660	1.1244	—	0.6708	1.8784	2.3202	0.4270	0.3270		1.1456	1.9398	2.6064
19	1.6918	1.1702	—	—	1.9466	2.4176	—	—		—	1.9620	2.6704
20	—	1.2032	—	—	2.0148	2.5030	—	—		—	—	2.7322
pH finale	2.9	3.1	5.6	2.7	3.1	3.5	3.—	3.4		2.8	3.4	3.7

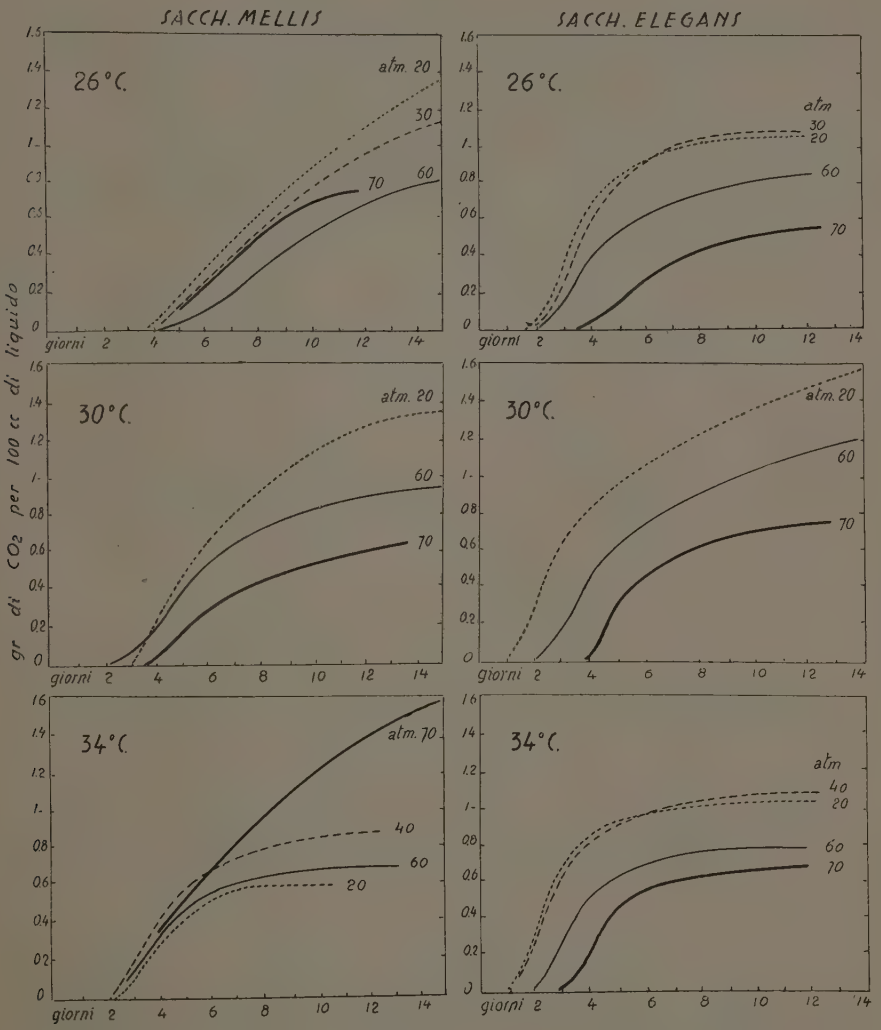

Fig. 1 - Andamento del processo fermentativo in *Sacch. mellis* e in *Sacch. elegans* a diverse temperature e diversa pressione osmotica.

pure lentamente anche sotto condizioni di elevata pressione osmotica.

b) peraltro, con l'aumentare della pressione osmotica, la fermentazione si fa progressivamente non solo più lenta, ma anche più fiacca.

c) la temperatura ha influenza sul processo fermentativo. Ed è risultato che la temperatura più alta, delle tre sperimentate (26°-30°-34°C.), accorcia la fase di latenza e imprime al processo un ritmo più celere. Particolarmente indicativo è il comportamento di *Sacch. elegans*. Ciò a differenza dei lieviti non osmofili che rispondono invece negativamente alle più alte temperature.

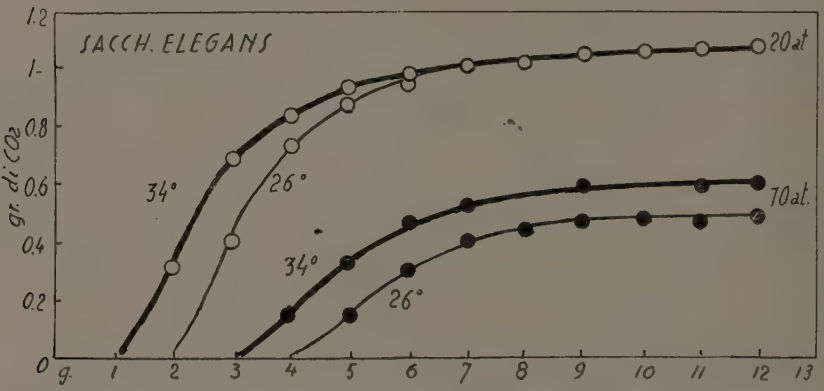

Fig. 2 - L'andamento del processo fermentativo in *Sacch. elegans* a temperature e pressioni osmotiche diverse.

Per quanto si riferisce all'*influenza del pH* è notato che:

a) il pH iniziale del mezzo condiziona la prima fase del processo fermentativo

b) la stessa influenza si manifesta in modo:

— relativamente identico sia per *S. mellis* che per *S. elegans*

— ancora identico per la più bassa (26°C.) e più alta (34°C.) temperatura

— caratteristicamente diverso, invece, in rapporto alla concentrazione osmotica

c) in mezzi a più bassa concentrazione osmotica (20-30 atm.) la fermentazione si svolge con ritmo più veloce e maggiore rendimento

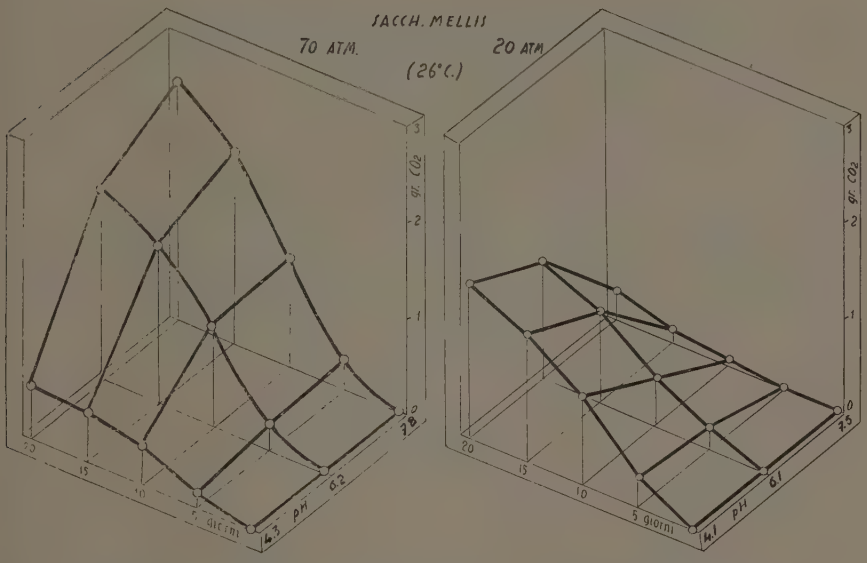

Fig. 3 - L'andamento fermentativo in *Sacch. mellis* a diverso pH e a diversa p. o..

quanto più il pH è basso. In *Sacch. mellis* è ad es. normale a pH 4.1, rallenta a pH 6.1, non ha luogo a pH 7.5. Anche in *Sacch. elegans* ha luogo solo a pH acido.

d) in mezzi ad elevata concentrazione osmotica (70 atm.) la fermentazione si svolge meglio a pH alcalino. Almeno in *Sacch. mellis;* in *Sacch. elegans* il fatto si ripete, ma con minore evidenza

e) in ogni caso il pH finale si abbassa notevolmente rispetto a quello iniziale

II — Le esigenze auxologiche di Sacch. mellis e Sacch. elegans

Vi sono generi le cui specie sono tutte e tipicamente auxoeterotrofe: così, ad es., in *Kloeckera* e in *Pichia.*

In altri generi — come in *Saccharomyces* — si hanno invece specie sia etero- che auxo-autotrofe, in più notandosi differenze anche tra ceppo e ceppo di una stessa specie.

Non ci risultano note le esigenze auxologiche di *Sacch. mellis*. Circa *Sacch. elegans* ricerche di RIBÉREAU-GAYON e PAYNAUD (7) indicano che esso, nei ceppi da loro studiati, esige per il suo sviluppo ac. pantotenico e, subordinatamente, biotina e tiamina.

METODO.

Mezzo base il liquido di WILLIAMS, privo o addizionato di vitamine. Colture in doppio in Erlenmeyer da cc 100 e 26° C. Inoculo, con una sospensione di giovani cellule, a nota densità, e previamente lavate. Controllo dello sviluppo per via fotometrica ogni 24 ore per cinque giorni.

RISULTATI.

I dati raccolti e che ci sembra superfluo riportare dettagliatamente hanno indicato che:

— *Sacch. mellis* è specie strettamente auxo-eterotrofa e che abbisogna di biotina, tiamina, piridossina, inositolo e ac. pantotenico.

— *Sacch. elegans* è anche questa — come già osservato da RIBÉREAU-GAYON e PEYNAUD — specie auxo-eterotrofa.

Mentre questi Aa. hanno trovato che essa, nei ceppi da loro studiati, abbisogna sopratutto di ac. pantotenico e subordinatamente di biotina, a noi è risultato, per il nostro ceppo, che questa specie e sopratutto biotina-dipendente.

III — PUNTO TERMICO DI UCCISIONE

La ricerca è stata motivata col fine di stabilire l'influenza esercitata, sul punto termico di uccisione, dalla differente pressione osmotica.

Si è operato come segue: con una sospensione omogenea di cellule furono inficiate, con un numero di cellule pari a $1/10^{-8}$, provette a pareti sottili contenenti cc 10 di liquido di Williams presenti quantità di zucchero corrispondenti a 20 e a 70 atm. di p. o..

Le provette venivano quindi poste in b. m. termostatico nel quale veniva collocata, per il controllo termico, una uguale provetta con uguale quantità di liquido di Williams e con un sottile termometro.

Il tempo veniva calcolato a partire dal momento nel quale le provette erano introdotte nel b. m. preventivamente portato alla voluta temperatura.

A termine dei rispettivi tempi le provette erano raffreddate e messe in termostato a 26°C. Il mancato sviluppo al 10° giorno di coltura dava indice della avvenuta morte delle cellule.

I risultati sono riferiti nella annessa Tabella.

T.°C	Tempi (minuti primi)	*Sacch. mellis* in liq. di Williams a		*Sacch. elegans* in liq. di Williams a	
		20 atm	70 atm.	20 atm.	70 atm
55°	5	+	+	+	+
	10	—	—	+	+
	15	—	—	+	+
60°	5	—	+	+	+
	10	—	—	+	+
	15	—	—	+	+
65°	5	—	—	+	+
	10	—	—	+	+
	15	—	—	+	+
70°	5			+	+
	10			+	+
	15			+	+
75°	5			—	+
	10			—	+
	15			—	+
80°	5			—	—
	10			—	—
	15			—	—

Essi indicano che *Sacch. elegans* si presenta notevolmente più resistente alla temperatura di *Sacch. mellis.*

Indicano inoltre che, sia l'una che l'altra specie, si presentano più resistenti in presenza di liquidi a più elevata p. o..

IV — Determinazione dei principali prodotti della fermentazione

Metodo.

Si è operato con il liquido di Williams (contenuto in grandi Erlenmeyer) opportunamente addizionato di zucchero fino a raggiungere il valore di 20 o di 70 atm. di p. o. e portato a pH 5 circa oppure a pH 6.4. Si voleva infatti vedere, per le due specie, il comportamento che avrebbero offerto nelle due condizioni di diversa pressione osmotica e di diverso pH.

Previa pastorizzazione i vari matracci furono inoculati con giovani colture sviluppate su infuso di malto.

Durata della fermentazione giorni 90 a 26°C.

Prove in doppio.

Al 90° giorno fu dosato l'alcool, l'acidità volatile, l'aldeide acetica, la glicerina e l'ac. succinico.

Per l'acool e l'acidità volatile furono impiegati i metodi ordinari; per l'aldeide acetica il metodo di Jaulmes e Espezel ([8]). La glicerina fu titolata previa defecazione del liquido di fermentazione per ossidazione periodica secondo De Queiroz Vasconcellos e Lancastre ([9]) (da noi opportunamente adattato ai mezzi altamente zuccherini) e l'acido succinico secondo il metodo di Kunz ([8]).

Risultati.

Sono riportati nella annessa Tab. V.

Produzione di alcool.

Sia per l'una che per l'altra specie il rendimento in alcool raggiunge valori modesti. Con tutto ciò le stesse specie appaiono diversamente sensibili alle condizioni osmotiche del mezzo poichè — almeno al 90° giorno — la produzione di alcool risulta maggiore per *Sacch. mellis* a 70 atm. che non a 20 atm. e questo a differenza di *Sacch. elegans*.

Il pH, più acido o meno acido, è sentito alla p. o. di 20 atm. da *Sacch. mellis* avendo dato un rendimento maggiore a pH meno acido (6.4); non differenze sensibili alla p. o. di 70 atm. come invece sembra che appaiano, per i precedenti dati raccolti, nei primi giorni della fermentazione.

All'opposto *Sacch. elegans* non è risultato sensibile al diverso pH nei mosti a 20 atm. di p. o., mentre è apparso sensibile alla p. o. di 70 atm. avendo dato un rendimento maggiore a pH 4.8 e minore a pH 6.4.

TAB. V - *Produzione dei principali prodotti di fermentazione da parte di* Sacch. mellis *e* Sacch. elegans *in diverse condizioni di p. o. e di pH.*

	p. o.	pH	in 100 ml di liquido: alcool etilico in vol.: (ml)	alcool etilico in peso: g	ac. volatile (in ac. acetico) mg	aldeide acetica mg	glicerina gr	acido succinico mg
Sacch. mellis	20 atm.	5.2	0.3 0.3 *0.3*	0.239 0.239 *0.239*	9 6 *7.5*	1.232 1.408 *1.320*	0.0323 0.0323 *0.0323*	50.74 51.92 *51.33*
		6.4	0.9	0.716	—	1.936	0.135	42.48
	70 atm.	4.8	2.0 2.6 2.3	1.590 2.067 1.828	30 24 *2.7*	4.048 3.520 *3.784*	0.452 0.450 *0.451*	57.82 60.18 *59.—*
		6.4	1.9 2.6 *2.25*	1.511 2.067 *1.789*	36 36 *36*	1.936 1.760 *1.848*	0.635 0.563 *0.599*	50.74 47.20 *48.97*
Sacch. elegans	20 atm.	5.2	4.7 4.1 *4.4*	3.737 3.260 *3.333*	96 90 *93*	6.160 5.984 *6.702*	0.438 0.351 *0.394*	61.36 61.36 *61.36*
		6.4	4.7 3.8 *4.25*	3.737 3.021 *3.244*	120 120 *120*	4.224 3.872 *4.048*	0.547 0.474 *0.510*	61.36 61.36 *61.36*
	70 atm.	4.8	4.1 3.4 *3.75*	3.260 2.703 *2.981*	84 78 *81*	7.216 7.392 *7.304*	0.216 0.207 *0.211*	62.54 62.54 *62.54*
		6.4	2.4 2.6 *2.5*	1.908 2.067 *1.987*	114 117 *115.5*	3.712 4.224 *3.968*	0.230 0.225 *0.227*	66.08 64.90 *65.49*

L'acidità volatile.

Un più chiaro confronto, anche rispetto alla produzione di alcool, è offerto dalla seguente tabella:

	p. o.	pH	alcool % in vol.	ac. volatile	
				in gr/l di ac. acetico	in gr. di ac. acetico per 100 cc di alcool
Sacch. mellis	20 atm.	5.2	0.30	0.075	2.5
		6.4	0.90	—	—
	70 atm.	4.8	2.30	0.27	1.17
		6.4	2.25	0.36	1.60
Sacch. elegans	20 atm.	5.2	4.40	0.93	2.11
		6.4	4.25	1.20	2.82
	70 atm.	4.8	2.75	0.81	2.94
		6.4	2.50	1.15	4.60

La produzione di acidi volatili è, in assoluto, contenuta entro limiti normali. Qualora si confronti, però, alla produzione d'alcool allora essa appare relativamente notevole. La diversa p. o. non sembra esercitare sulla produzione di acidi volatili grande influenza. Una certa se pur non rilevante influenza sembra invece esercitare il pH avendo ottenuto valori maggiori a pH meno acido.

L'aldeide acetica.

Nei riguardi della produzione di aldeide acetica *Sacch. elegans* si è dimostrato assai più attivo di *Sacch. mellis*. In questa specie una qualche influenza è esercitata dalla p. o. avendosi ottenuto più elevate quantità nei mezzi a 70 atm.

In ogni caso e in armonia a quanto è noto evidente influenza esercita il pH del mezzo colturale. Infatti sia per *Sacch. mellis*, che per *Sacch. elegans* la quantità di aldeide acetica diminuisce con l'innalzarsi del pH; e questo all'opposto di quanto si verifica nei riguardi dell'acidità volatile (ac. acetico).

La glicerina.

Sono note le ampie variazioni cui va soggetta la formazione di glicerolo in dipendenza delle tante variabili che concorrono al processo fermentativo, e sopratutto note sono le variazioni che si hanno nel rapporto alcool/glicerolo. Queste, legate alla composizione del mezzo, al suo pH e al periodo della fermentazione appaiono altresì dipendenti dalla natura del lievito. Trovava ad esempio ANTONIANI che i Lieviti ad « alto potere fermentativo » (tipo *Sacch. ellipsoideus*) danno un rapporto alcool/glicerolo oscillante tra un minimo di 8.9 ad un massimo di 14.1, mentre quelli a « basso potere fermentativo » tipo (*Kloeckera apiculata*) danno valori compresi tra 3.2 e 6.1 ([10]).

Per quanto si riferisce alle due specie da noi studiate il rapporto alcool/glicerina assume i valori riportati in tabella.

Si osserva che le due specie presentano un comportamento tra loro diverso in quanto il rapporto alcool/glicerina figura più basso per *Sacch. mellis* che per *Sacch. elegans;* ed inoltre, mentre lo stesso rapporto si abbassa, per *Sacch. mellis*, con l'innalzarsi della pressione osmotica, all'opposto avviene per *Sacch. elegans*. In altri termini l'influenza della diversa p. o. si manifesta in maniera differente nelle due specie. In *Sacch. mellis* ad una maggiore concentrazione zuccherina del mosto corrisponde una maggiore produzione di glicerina; in *Sacch. elegans*, come aumenta la concentrazione zuccherina del mosto diminuisce la produzione di glicerina.

L'influenza del pH era prevedibile poichè è già noto l'instaurarsi, in reazione alcalina, della terza forma di fermentazione di Neuberg. Noi si è operato, peraltro, in reazione più acida (pH 4.8-5.2) o meno acida (pH 6.4), ma mai decisamente alcalina; era interessante vedere, pertanto, se anche senza giungere al prevalere della concentrazione ossidrilionica, non fosse registrabile un incremento nella formazione di glicerina. Tanto, come si prevedeva, si è verificato sia nell'una come nell'altra specie e indipendentemente dal variare della pressione osmotica.

L'acido succinico.

Anche la produzione di ac. succinico, al pari della glicerina, subisce variazioni di un certo rilievo e non solo indipendenza delle condizioni nelle quali si svolge la fermentazione, ma anche in rapporto alle caratteristiche dei vari lieviti con riferimento non solo alla specie

ma addirittura al ceppo. Tanto sono sensibili queste variazioni che esse hanno consentito a PEYNAUD, ad es., a distinguere nell'ambito di *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* e in rapporto alla produzione di ac. acetico, ceppi cosidetti « succinogeni », « equilibrati » ed « acetogeni ». Nei primi il rapporto 100 ac. acetico/succinico è minore di 75; nei secondi è compreso tra 75-125; negli ultimi è maggiore di 125.

I valori di 100 a/s nelle diverse condizioni sperimentate sono stati, per *Sacch. mellis* e *Sacch. elegans*, i seguenti

	S. mellis				*S. elegans*			
p. o.	20		70		20		70	
pH	5.2	6.4	4.8	6.4	5.2	6.4	4.8	6.4
100 a/s	14.7	?	45.6	73.4	151.5	195.4	129.6	176.3

Relativamente ai ceppi sperimentati *Sacch. mellis* si è presentato decisamente succinogeno e *Sacch. elegans*, al contrario, decisamente acetogeno.

Per quanto si riferisce all'influenza della pressione osmotica i dati raccolti non forniscono, sia per l'una che per l'altra specie, indicazioni precise. Abbastanza chiara appare invece l'influenza del pH poichè si sono ottenuti valori sempre maggiori nei mezzi meno acidi.

CONCLUSIONI

Le ricerche compiute sopra i due lieviti osmofili *Sacch. mellis* e *Sacch. elegans* portano a concludere quanto segue:

I) Concentrazione zuccherina (pressione osmotica), temperatura e pH, influenzano l'andamento delle prime fasi del processo fermentativo.

Lo stesso non viene inibito dalle elevate pressioni osmotiche (per es. 70 atm.); però rallenta con l'elevarsi delle condizioni osmotiche.

La temperatura più alta, delle tre sperimentate (26°-30°-34° C.) accorcia la fase di latenza e imprime al processo fermentativo un ritmo più celere.

Il pH iniziale condiziona la prima fase del processo fermentativo, ma in maniera diversa conforme la diversa p. o.: a p. o. più bassa la fermentazione si svolge con ritmo più veloce e maggiore rendimento quanto più il pH è basso; nei mezzi a più elevata p. o. la fermentazione si svolge meglio, invece, a pH alcalino.

II) Nei riguardi delle esigenze auxologiche è risultato, per i ceppi studiati, che *Sacch. mellis* abbisogna di biotina, tiamina, piridossina, inositolo ed acido pantotenico; *Sacch. elegans* abbisogna invece di biotina e di ac. pantotenico.

III) Il punto termico di uccisione è diverso per le due specie studiate essendo risultato assai più resistente *Sacch. elegans* che *Sacch. mellis;* in ogni caso la più elevata p. o. crea condizioni di maggiore resistenza.

IV) Nei riguardi dei principali prodotti di fermentazione è risultato per essi quanto segue:

— l'*alcool etilico* si produce in quantità modesta — sia ad opera di *Sacch. mellis* che di *Sacch. elegans* — e con variazioni che risentono della p. o. e del pH.

— l'*acidità volatile* è, in assoluto, contenuta entro limiti normali sia per l'una che per l'altra specie; appare invece elevata qualora si consideri in rapporto alla produzione di alcool.

— l'*aldeide acetica* è prodotta più da *Sacch. elegans* che da *Sacch. mellis* essendo in ogni caso influenzata dal pH del mezzo.

— la *glicerina* o, meglio, il rapporto alcool/glicerolo si presenta più basso per *Sacch. mellis* che per *Sacch. elegans.* Tale rapporto tende poi ad abbassarsi in *Sacch. mellis* e ad innalzarsi in *Sacch. elegans* con l'elevarsi della p. o., e a spostarsi — come era prevedibile — sotto l'influenza del pH.

— anche l'*acido succinico,* infine, è prodotto in misura diversa dalle due specie studiate e non poco influenzata, la stessa produzione, appare dal pH del mezzo. Considerata, la quantità di ac. succinico prodotta, in rapporto alla quantità di acido acetico si osserva che *Sacch. mellis* si comporta come « lievito succinogeno » e *Sacch. elegans come* « lievito acetogeno ».

Riassunto. — *Nel presente lavoro l'A. si è proposto di studiare alcuni aspetti relativi la fisiologia di* Sacch. mellis *e* Sacch. elegans, *specie di lieviti osmotolleranti.*

Pertanto viene riferito intorno all'andamento delle prime fasi del processo fermentativo in rapporto alle diverse condizioni di pressione osmotica, temperatura e pH del mezzo; vengono precisate le esigenze auxologiche delle due specie e stabilito il punto termico di uccisione;

finalmente viene riferito sopra i principali prodotti di fermentazione (etanolo, ac. acetico, aldeide acetica, glicerina, ac. succinico) formatisi sotto condizioni diverse di pressione osmotica e di pH.

Summary. — *In the present note some aspects relative to the physiology of the osmophilic yeasts* Saccharomyces mellis *and* Sacch. elegans, *are studied.*

Is therefore referred about the pattern of the first phases of the fermentative process in relation to different conditions of osmotic pressure, temperature and pH of the medium; the auxological requirements of the two species are puntualized and the thermal death time established; finally is referred on the main fermentation products (ethanol, acetic acid, acetic aldehyde, glicerol, succinic acid) which are formed under different conditions of osmotic pressure and pH values.

BIBLIOGRAFIA

(1) Lodder J. e Kreger-van Rij N. J. W. - *The Yeasts. A taxonomic study.* Amsterdam 1952 - Ed. North-Holland Publ. Co.

(2) Verona O. e Zardetto de Toledo O. - *Intorno ad un lievito osmofilo sistematicamente prossimo a Sacch. elegans Lodder et Kreger-van Rij.* Mycopathologia et Mycologia aplicata. vol. 11, p. 103, 1959.

(3) Mrak E. M. e Phaff H. J. - *Yeasts,* in Annual Review of Microbiology, vol. *II,* p. 1, 1948.

(4) Vedi il citato lavoro di Mrak e Phaff.

(5) Scarr M. P. - *Osmophilic Yeasts in Raw Beet and Cane Sugars and intermediate Sugar - refining products.* J. Gen. Microbiol., vol. 5, p. 704, 1951.

(6) Si vedano anche i lavori di:
Onishi H. - *Studies on Osmophilic Yeasts* - Bull. Agr. Chem. Soc. Japan. vol. 21, p. 137. 143, 151, 1957; id., vol. 23, p. 332, 351, 353, 1959; id., vol. 24, p. 126, 131, 226, 386, 1960; Agr. aud Biol. Chem., vol. 25, p. 124, 341, 1961.

(7) in: Ribéreau-Gayon J. e Peynaud E. - *Traité d'Oenologie* Paris, 1960.

(8) in: Ribéreau-Gayon J. e Peynaud E. - *Analyse et contrôle des vins.* Paris, 1951.

(9) De Queiroz Vasconcellos A. e Lancastre - *Doseamento da glicerina no vinho do Porto e nos vinhos de Pasto* - Anais do Inst. do Vinho do Porto, 1946.

(10) Antoniani C., Federico L e Gobis L. - *Rapporto alcool/glicerolo e « potere fermento » dei lieviti alcoolici.* La Ricerca Scientifica, vol. 24, p. 55, 1954